

Aus dem Landesveterinäruntersuchungsamt Berlin
Direktor: Prof. Dr. E. Hellmann

ZUR FRAGE DER LOKALISATION
DER DURCH TRYPSINVERDAUUNG AKTIVIERBAREN,
ZELLGEBUNDENEN TOXINE DER BAZILLEN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Gisela M e r c k geb. Kähler
Tierärztin aus Königsberg/Pr.

Berlin 1973

Journal-Nr. 815

Aus dem Landesveterinäruntersuchungsamt Berlin
Direktor: Prof. Dr. E. Hellmann

ZUR FRAGE DER LOKALISATION
DER DURCH TRYPSINVERDAUUNG AKTIVIERBAREN,
ZELLGEBUNDENEN TOXINE DER BAZILLEN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Gisela M e r c k geb. Kähler
Tierärztin aus Königsberg/Pr.

Berlin 1973

Journal-Nr. 815

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

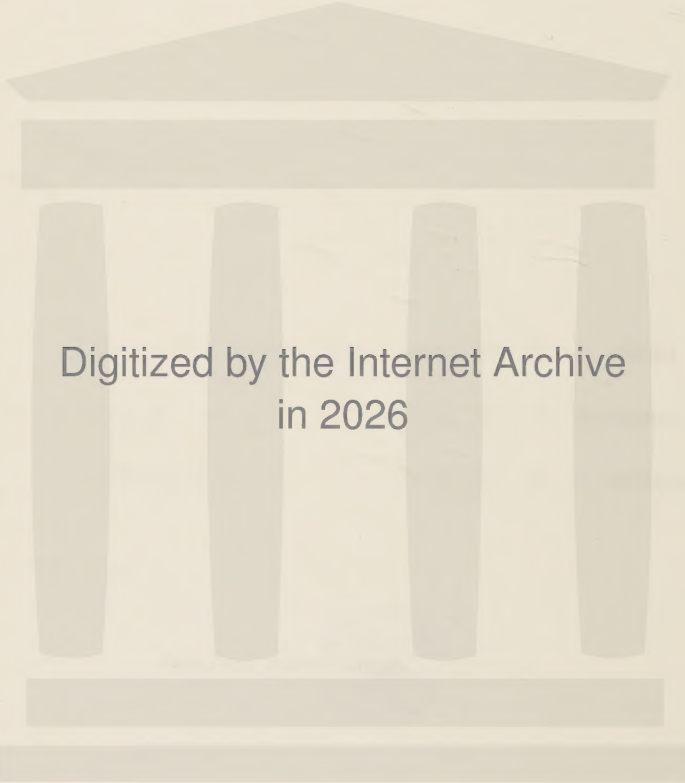
Fachbereichsvorsitzender: Prof. Dr. H.-J. Sinell

Referent: Prof. Dr. E. Hellmann

Korreferent: Prof. Dr. H. G. Hilliger



Tag der Promotion: 11. 7. 1973



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis

Seite

1.	Einleitung	1
2.	Literatur	3
3.	Eigene Untersuchungen	6
3.1.	Material und Methoden	6
3.1.1.	Gewinnung intakter Keime	6
3.1.2.	Protoplastengewinnung	6
3.1.3.	Zellwandgewinnung	7
3.1.4.	Technik der Trypsinverdauung	9
3.1.5.	Gewinnung des Immunserums	9
3.1.6.	Bestimmung der letalen Dosis 50 % (LD_{50})	10
3.1.7.	Methode der Serumabsättigung	11
3.1.8.	Neutralisationsversuche	11
3.2.	Ergebnisse	13
3.2.1.	Gewinnung von Zellwand- und Protoplastenmaterial	13
3.2.2.	Toxizitätsprüfung von intakten Keimen, Zellwänden und Protoplasten	13
3.2.3.	Serumneutralisationsversuche	17
4.	Besprechung der Ergebnisse	21
5.	Zusammenfassung	25
6.	Literaturverzeichnis	26

1. Einleitung

Im Zusammenhang mit Untersuchungen über die Pathogenese der durch Bazillen ausgelösten Lebensmittelvergiftungen hat HELLMANN (1972) festgestellt, daß es möglich ist, die Toxizität von Bazillen durch Verdauen mit Trypsin erheblich zu steigern. Diese Toxizität geht von der Bakterienzelle aus.

Demgegenüber wurden bisher für die pathogene Wirkung des *Bacillus cereus* die biologisch aktiven Stoffwechselprodukte dieser Keimart in Anspruch genommen. Nach den von GOEPFERT (1971) zusammengefaßten Untersuchungen bildet *B. cereus* eine Reihe von Enzymen, wie Lecithinase, Urease, Nitratreduktase und Toxinen, wie hämolytische, dermonekrotische und mäuseletale Toxine. SPIRA und GOEPFERT (1972) äußerten die Ansicht, daß Toxine als Ursache von Lebensmittelvergiftungen anzusehen sind. Nach NYGREN (1962) soll für die Lebensmittelvergiftungen die Lecithinase verantwortlich sein, die aus dem in den Nahrungsmitteln vorhandenen Lecithin Phosphocholin abspaltet, welches sich in Versuchen am isolierten Kaninchendarm tonussteigernd und kontraktionsanregend erwies.

Meine Aufgabe bestand darin zu prüfen, ob die durch Trypsin aktivierbare toxische Wirkung der Bazillen ihren Ausgang von der Bakterienwand nimmt, oder ob auch der Protoplast daran beteiligt ist. Eine Anregung zur Bearbeitung dieser Frage war nicht zuletzt die Tatsache, daß unter den für die Untersuchung zur Verfügung stehenden, aus Lebensmitteln isolierten Bazillenstämmen auch einige der Art *B. megaterium* waren. *B. megaterium* ist aber nach den Untersuchungen von WEIBULL (1953) zur Herstellung von Protoplasten mit Hilfe von Lysozym besonders gut geeignet.

Die Toxizitätsprüfungen wurden an Mäusen durchgeführt. Um die Aufgabe zu lösen, bestimmte ich den Toxizitätsgrad der intakten

Keime im unbehandelten Zustand und nach Trypsinverdauung. Sodann gewann ich mit Hilfe von Ultraschall Zellwandmaterial, das ebenfalls im unverdauten und im verdauten Zustand auf den Grad der Toxizität geprüft wurde. Das gleiche geschah schließlich mit den Protoplasten.

Nachdem sich bei diesen Versuchen herausgestellt hatte, daß auch den Protoplasten eine toxische Wirkung zukommt, überprüfte ich in einem zweiten Versuchsabschnitt auf serologischem Wege die Identität der Toxine. Zu diesem Zweck wurde durch Injektion intakter, trypsinverdauter Keime ein Kaninchenimmunsorum gewonnen und der Neutralisationstiter dieses Serums gegenüber dem homologen Präparat nach Absättigung des Serums mit Zellwänden oder mit Protoplasten bestimmt.

2. Literatur

Untersuchungen über die Wirkungssteigerung der Toxine von *C. botulinum* durch Trypsinverdauung veranlaßten BONVENTRE und KEMPE (1960) zu der Äußerung, daß diese Wirkungssteigerung möglicherweise als Modell für den Einfluß aufzufassen ist, den die proteolytischen Enzyme im menschlichen Intestinaltrakt auf mit der Nahrung zugeführtes Botulinustoxin ausüben. Diese Vermutung regte HELLMANN (1972) zu seinen Versuchen über den Einfluß einer Verdauung mit Trypsin auf die Toxizität von Bazillen an. HELLMANN stellte fest, daß nicht nur *B. cereus*, sondern auch andere aerobe Sporenbildner toxische Wirkung zeigen, diese aber nicht von Stoffwechselprodukten, sondern von der Bakterienzelle selbst ausgeht. Die toxische Wirkung der Kulturfiltrate von *B. cereus* war schon vorher von zahlreichen Autoren beschrieben worden (BURDON u. WENDE 1960, MOLNAR 1962, STAMATIN u. ANGHELESCO 1963, BONVENTRE u. ECKERT 1963, JOHNSON u. BONVENTRE 1967 und KRIEG 1970). Daß diese nicht gleichartig ist mit der von HELLMANN vermuteten, an den Bakterienkörper gebundenen Toxizität der aeroben Sporenbildner, wird durch die Feststellung bekräftigt, daß die in Filtraten gefundene toxische Wirkung durch Trypsinverdauung nicht aktiviert werden kann (JOHNSON u. BONVENTRE 1967, KRIEG 1970).

Eine Bestätigung des Vorhandenseins zellgebundener toxischer Aktivität der Bazillen könnten möglicherweise auch die Versuchsergebnisse von SPIRA u. GOEPFERT (1972) sein. Sie beschickten durch Ligaturen vom übrigen Darm getrennte Darmabschnitte junger Kaninchen mit Bazillenmaterial und stellten fest, daß sowohl nach Einwirkung versporteter Bakteriensuspensionen als auch zellfreier Kulturfiltrate sowie gewaschener vegetativer Keime von *B. cereus* und *B. thuringiensis* im Darmlumen Flüssigkeitsansammlungen auftraten. Sie glaubten ausschließen zu können, daß dieser Ausdruck einer entzündlichen Reaktion die Folge einer Infektion war,

sondern vermuteten eine Intoxikation.

Über den Angriffspunkt der Protease Trypsin am Bakterienkörper bestehen bisher nur Vermutungen. Wie weit Ergebnisse von Untersuchungen über durch Trypsin hervorgerufene Veränderungen an der Zellwand von Streptokokken (BARKULES u. JONES 1957, TEPPER, HAYASHI u. BARKULES 1960) auf Bazillen übertragbar sind, ist unklar. Denn bei Streptokokken löst Trypsin rund 40 % des Zellwandmaterials (BARKULES u. JONES 1957), während HELLMANN (1972 b) nur einen geringfügigen Substanzverlust der Bazillen durch Trypsinverdauung ermittelte. Doch die bei Streptokokken auftretende Unangreifbarkeit von Glukosamin und Muraminsäure für Trypsin wurde auch bei anderen Bakterienarten festgestellt (SALTON 1964). Glukosamin und Muraminsäure sind Bestandteile des der Bakterienzelle Form und Festigkeit verleihenden Mukopeptidkomplexes, der bei gramnegativen Zellen als Grundlage für einen Lipoproteinpolysaccharidkomplex dient. Der Mukopeptidkomplex grampositiver Keime enthält dagegen nur drei bis vier Aminosäuregruppen. Zu ihnen gehört die Diaminopimelinsäure, die nachweislich in den Wänden von *B. subtilis* zu finden ist (SALTON 1964). Nach SALTON wurden aus den Zellwänden keine Verbindungen durch Trypsin herausgelöst, in denen Muraminsäure und Diaminopimelinsäure nachweisbar waren.

Voraussetzung zur Lösung der Frage nach der Lokalisation der durch Trypsin aktivierbaren Bazillentoxine ist die reine Gewinnung der Hauptzellbestandteile, des Protoplasten und der Zellwand. Zur Darstellung des von der Zellwand befreiten Zellinneren, dem Protoplasten, eignet sich die Methode der Zellwandverdauung mit Lysozym. TOMCSIK und GÜEX-HOLZER (1952) wiesen mit immunochemisch-zytologischen Methoden nach, daß Lysozym bei einem lysozymempfindlichen *Bacillus* auf die Zellwand einwirkt. Sie vermuteten, daß diese Wirkung die einer Polysaccharase ist und in einem

spezifischen Abbau der Zellwandstruktur besteht. SALTON (1952) und WEIBULL (1953) unterstützten diese Vermutung. WEIBULL gelang es nicht nur, bei *B. megaterium* mit Hilfe von Lysozym die Zellwand völlig zu entfernen, sondern er konnte auch die Protoplasten über Stunden durch Aufbewahrung in einem spezifischen Medium, einer Saccharose-Phosphatpufferlösung, intakt erhalten.

Zur Isolierung der zweiten großen Zellkomponente, der Zellwand, bietet sich die mechanische Zertrümmerung der Keime und anschließendes fraktioniertes Zentrifugieren an. Denn diese Art der Gewinnung scheint keine chemische oder biochemische Veränderung der Bakterienwandkomponenten zu bewirken (SALTON 1953). SALTON u. HORNE (1951) beschrieben eine Methode der mechanischen Aufbrechung der Keime durch Ultraschall. Die Beschallung der Bakterien bewirkt zunächst ein Aufbrechen der Zellstruktur, das durch das Auftreten isolierter Zellwände unter dem Phasenkontrastmikroskop demonstriert werden kann. In geeignetem Medium folgt die Lysis des Zytoplasmas, deren Ursache enzymatischer oder physikalischer Natur sein wird (ROTMAN 1956). VENNES und GERHARDT (1959) übernahmen die von SALTON u. HORNE (1951) vorgeschlagene Methode der Zellwandgewinnung durch Ultraschall, um Antigenanalysen isolierter Zellstrukturen von *B. megaterium* durchzuführen. Nach Gewinnung von Immunseren gegen Zellwände und Protoplasten bzw. Protoplastenmembranen führten sie Komplementbindungsreaktionen durch und stellten fest, daß keine Kreuzreaktionen zwischen Zellwänden und Protoplasten auftraten. Damit bestätigten sie von TOMCSIK u. GUEX-HOLZER (1954) veröffentlichte Versuchsergebnisse, die bei *B. M.*, einem dem *B. megaterium* sehr ähnlichen Keim, eine Antigenverschiedenheit zwischen Protoplasten und Zellwänden gefunden hatten. TOMCSIK u. GUEX-HOLZER sowie VENNES u. GERHARDT stimmen darin überein, daß die Antigenität der Zellwand an eine Polysaccharidkomponente gebunden ist.

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Material und Methoden

Alle Untersuchungen wurden am *B. megaterium* St. D 2217 durchgeführt (Herkunft: gebr. Bratwurst).

Für die Mäuseversuche dienten konventionell gehaltene, 20 g schwere Mäuse beiderlei Geschlechts, die vom NMRI-Stamm (Hannover) abstammten.

3.1.1. Gewinnung intakter Keime

Auf gewöhnlichen Nähragarplatten (Agar Fa. Merck) 24 Stunden bei 37° gewachsenes Kulturmaterial wurde mit phys. NaCl-Lösung abgeschwemmt und in 2%ige Peptonlösung (Fa. Difco) verimpft. Die Bebrütung erfolgte 18 Stunden bei Zimmertemperatur im Erlenmeyerkolben unter Schütteln. Anschließend wurden die Keime durch halbschnelles Erhitzen im Dampftopf abgetötet. Zur Kontrolle der vollständigen Abtötung wurden drei Agarplatten mit Keimmaterial beimpft und nach 24stündiger Aufbewahrung im Brutschrank auf Wachstum geprüft. Das im Dampftopf abgetötete Keimmaterial wurde abzentrifugiert (4500 U/Min.) und einmal mit phys. NaCl-Lösung ausgewaschen. Entweder wurden nun die Keime verdaut (s. Technik der Trypsinverdauung) und anschließend gefriergetrocknet, oder sie wurden unverdaut gefriergetrocknet.

3.1.2. Protoplastengewinnung

Auf gewöhnlichen Nähragarplatten (Agar Fa. Merck) 24

Stunden bei 37° C gewachsenes Kulturmateriel wurde mit phys. NaCl-Lösung abgeschwemmt und in 2%ige Peptonlösung (Difco) verimpft. Die Bebrütung erfolgte 10 Stunden bei Zimmertemperatur im Erlenmeyerkolben unter Schütteln. Die Flüssigkeitshöhe betrug dabei maximal 25 mm, um eine genügend starke Sauerstoffzufuhr zu gewährleisten (WEIBULL 1953). Anschließend wurde das Kulturmateriel abzentrifugiert, mit 0,3 m Phosphatpuffer (pH 6,1) ausgewaschen und in ein Medium folgender Bestandteile aufgenommen (FITZ-JAMES 1958):

0,1 m Saccharose
0,3 m Phosphatpuffer (pH 6,1)
0,016 m MgSO_4

Dieser Suspension, eingestellt auf Röhrchen 3 der McFarlandschen BaSO_4 -Standardserie, wurde Lysozym (Fa. Serva, 3xkrist., reinst) in einer Menge von 0,5 mg/ml hinzugefügt (WEIBULL 1953). Die Protoplastenbildung fand bei Zimmertemperatur in verschlossenen Zentrifugenröhrchen statt. Eines der Röhrchen diente als Kontrolle zur Probenentnahme, um mit Hilfe des Phasenkontrastmikroskopes die Protoplastenentwicklung zu verfolgen. Nach Abschluß der Protoplastenbildung (nach etwa 4 - 5 Stunden) wurde die Suspension vorsichtig zentrifugiert (2000 U/Min), der so gewonnene Bodensatz wieder in oben beschriebenes Medium aufgenommen und diese Suspension eine halbe Stunde bei 100° C im Dampftopf gehalten. Nach erneutem Zentrifugieren wurde der Bodensatz verdaut (s. Technik der Trypsinverdauung) und gefriergetrocknet bzw. unverdaut gefriergetrocknet.

3.1.3. Zellwandgewinnung

Die Zellwände wurden durch mechanisches Zertrümmern der

Bakterien mit Hilfe von Ultraschall und anschließendes gründliches Auswaschen mit Aqua dest. gewonnen (SALTON und HORNE 1951). Als Ausgangsmaterial dienten auf gewöhnlichen Nähragarplatten (Agar Fa. Merck) 24 Stunden bei 37° C gewachsene Bakterienkulturen. Nach Abschwemmung mit phys. NaCl-Lösung wurden sie in 2%ige Peptonlösung (Difco) verimpft. Die Bebrütung erfolgte 18 Stunden bei Zimmertemperatur im Erlenmeyerkolben unter Schütteln.

Nach Abzentrifugieren der Keime (4500 U/Min) wurden sie mit 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,3) ausgewaschen und anschließend mit dem gleichen Puffer so versetzt, daß die Suspensionsdichte Röhrchen 2 der McFarlandschen BaSO₄-Standardserie entsprach. Je 30 ml dieser Keimsuspension wurden nun 15 Minuten mit Ultraschall bei vollem Leistungseinsatz des Gerätes (Branson Sonic Power, Modell S-75, Power Supply, 20 kc) behandelt. Um beim Beschallen auftretende Nebenprodukte sich absetzen zu lassen, stand die beschallte Suspension anschließend etwa 18 Stunden im Kühlschrank. Es bildete sich ein schwarz-grauer Bodensatz, der bei mikroskopischer Betrachtung aus rußähnlichen Partikeln bestand, die vom bei längerem Beschallen auftretenden Substanzverlust des Ultraschallstabes herkommen müssen. Der Überstand wurde abgegossen und zentrifugiert (8000 U/Min). Das so gewonnene Sediment enthielt das Zellwandmaterial. Phasenkontrastmikroskopische Untersuchungen gaben jetzt sowie während und nach dem nun folgenden fünfmaligen Auswaschen mit Aqua dest. Auskunft über den Reinheitsgrad des Materials. Da die Ausbeute beim Beschallen gering war, wurden die Zellwände zunächst bei -19° C tiefgefroren. Nach Gewinnung einer genügend großen Materialmenge wurden sie aufgetaut, verdaut (s. Technik der Trypsinverdauung) und gefriergetrocknet bzw. unverdaut gefriergetrocknet.

3.1.4. Technik der Trypsinverdauung

Die Technik der Verdauung wurde von HELLMANN (1972) übernommen. Dem jeweiligen Kulturmateriel (intakte Keime, Protoplasten oder Zellwänden) wurde nach Ermittlung des Feuchtgewichtes die vierfache Menge (g=ml) einer 1%igen Lösung von Trypsin (Trypsin 2000 E/g, Fa. Merck) in Phosphatpuffer (pH 6,0) zugesetzt. Bei der Verdauung von Protoplasten enthielt der Puffer 0,2 m Saccharose. Nach einer Einwirkungszeit von zwei Stunden bei 37° C wurde das verdaute Material abzentrifugiert, einmal mit Phosphatpuffer ausgewaschen und anschließend gefriergetrocknet.

3.1.5. Gewinnung des Immunserums

Es wurde ein Immunserum gegen gefriergetrocknete, intakte Keime, abgetötet und verdaut, hergestellt. Einem etwa ein Jahr alten Kaninchen wurde dazu eine Aufschwemmung des Kulturmateriels mit phys. NaCl-Lösung dreizehnmal im Abstand von drei bis vier Tagen intravenös injiziert. Die Injektionsmenge steigerte sich von 0,004 mg Trockensubstanz auf 4,0 mg Trockensubstanz.

Mit Hilfe der Komplementbindungsreaktion wurde der Antikörpertiter des Serums festgestellt. Das Antigen für die KBR wurde auf folgende Weise hergestellt: 140 mg gefriergetrocknete, intakte, verdaute Keime wurden in 10 ml Aqua dest. suspendiert. Eine von dieser Suspension mit Hilfe von phys. NaCl-Lösung hergestellte Verdünnung von 1 : 32 wurde bei 1000 U/Min. zentrifugiert, und der Überstand diente als Antigen.

Die Reaktionskomponenten wurden in einer Menge von jeweils

0,25 ml angesetzt. Das frische Meerschweinchenkomplement fand in 3%iger Konzentration Verwendung, die Hammelblutkörperchen in 4%iger Verdünnung. Nach 30minütiger Inkubation bei 37° C wurde ein Antikörpertiter des Serums von 1 : 640 festgestellt.

3.1.6. Bestimmung der letalen Dosis 50 % (LD₅₀)

Die LD₅₀ wurde von verdautem und unverdautem Keimmaterial (intakten Keimen, Protoplasten und Zellwänden) ermittelt. Nachdem zur Feststellung der in Frage kommenden Konzentrationsstufen orientierende Vorversuche durchgeführt worden waren, wurde die jeweils benötigte Menge gefriergetrockneten Materials in Aqua dest. aufgenommen und davon mit Ringerlösung geometrisch fallende Verdünnungsreihen hergestellt. Pro Verdünnungsstufe erhielten je fünf Mäuse 0,2 ml injiziert.

Die Berechnung der LD₅₀-Werte wurde nach der Methode von Spaerman-Kärber nach folgender Formel durchgeführt:

$$m = x_k + \frac{1}{2} \cdot d - d \cdot \frac{SP_i}{100}$$

Dabei bedeutet:

x_k den Logarithmus der kleinsten Dosis, von welcher ab stets 100%ige Reaktionen beobachtet werden,

d den Logarithmus des Verhältnisses je zweier aufeinanderfolgender Dosen,

P_i die Häufigkeit (in Prozent) der Reaktionen bei der i -ten Dosis ($i=0, 1, 2, \dots, k$); x_0 ist der Logarithmus der größten Dosis, bis zu welcher kein Tier reagiert. Also ist $P_0=0\%$ und $P_k=100\%$.

S bedeutet das Summenzeichen; es ist $SP_i = P_0 + P_1 + \dots + P_k$.
(CAVALLI-SFORZA, 1969).

3.1.7. Methode der Serumabsättigung

15 mg gefriergetrocknetes Kulturmateriel (intakte Keime, Protoplasten oder Zellwände) wurden in 2 ml Ringerlösung aufgenommen. Zu den 2 ml dieser Materialaufschwemmung wurden 2 ml Immunserum hinzugefügt. Nach zweistündiger Aufbewahrung bei 37° C wurde diese Suspension 18 Stunden im Kühlschrank stehengelassen und anschließend zentrifugiert (20 Min., 8000 U/Min). 2 ml des Überstandes wurden nochmals mit 2 ml Kulturmaterielaufschwemmung in oben beschriebener Weise behandelt. Nach Beendigung der Absättigung war das Immunserum im Verhältnis 1 : 4 verdünnt.

3.1.8. Neutralisationsversuche

Um dem Test die größtmögliche Empfindlichkeit zu verleihen, d.h., auch geringe Mengen toxinneutralisierender Antikörper noch zu erfassen, wurden die Versuche mit einer Keimmenge von lediglich zwei LD₅₀ durchgeführt. Dies geschah, indem eine Menge von gefriergetrocknetem Kulturmateriel von intakten, verdauten Keimen, die der 200fachen LD₅₀ entsprach, mit Hilfe der Gewebemühle homogenisiert und in 100 ml Ringerlösung suspendiert wurde.

Von folgenden Seren wurden mit Ringerlösung geometrisch fallende Verdünnungsreihen hergestellt:

1. von mit intakten Keimen abgesättigtem Immunserum
2. von mit Protoplasten abgesättigtem Immunserum
3. von mit Zellwänden abgesättigtem Immunserum
4. von nicht abgesättigtem Immunserum
5. von Normalserum

Jedem ml verdünnten Serums wurde ein ml der Bakteriensuspension (s.o.) zugesetzt, und dieses Gemisch blieb eine Stunde bei 37° C stehen.

Pro Verdünnungsstufe erhielten 5 Mäuse je 0,2 ml i.p. injiziert. Die Berechnung der ND_{50} erfolgte nach der Methode von Spearman-Kärber (s. Bestimmung der LD_{50}).

3.2. Ergebnisse

3.2.1. Gewinnung von Zellwand- und Protoplastenmaterial

Die Ultraschallbehandlung zur Gewinnung von Zellwänden bewirkte eine fast 100%ige Zerstörung der Bazillen, die durch Phasenkontrastmikroskopie demonstriert werden konnte. Die Bakterien schienen etwa im Verlauf ihrer Querachse aufgebrochen zu sein. Intrazelluläres Material in Form zahlreicher Granula lagerte sich verteilt außerhalb der Zellwände bzw. bildete größere Granulahaufen. Nach fünfmaligem Auswaschen mit Aqua dest. zeigte das mikroskopische Präparat nur noch geringe Anteile an intrazellulären Granula. Diese konnten auch durch weiteres Auswaschen nicht entfernt werden.

Die Lysozymbehandlung der Bazillen führte zur Umwandlung in sphärische Protoplasten, die nach vier bis fünf Stunden beendet war. Dabei blieben etwa 20 % der Keime scheinbar intakt, doch zeigten diese Keime bei phasenkontrastmikroskopischer Betrachtung eine gewisse Auflockerung ihrer Zellwände und einen Verlust an Deutlichkeit ihrer Konturen.

3.2.2. Toxizitätsprüfung von intakten Keimen, Zellwänden und Protoplasten

Intakte Keime, Zellwände und Protoplasten, unverdaut und verdaut, wirkten nach i.p. Applikation für Mäuse toxisch und führten bei entsprechender Dosierung zum Tode der Tiere (s. Tab. 1 S. 14 + 15).

Um die toxische Wirkung der einzelnen Fraktionen vergleichen zu können, wurden die LD_{50} -Werte ermittelt. Aus den LD_{50} -Werten (Tab. 2) ist zu ersehen, daß im Verhältnis zu den intakten, nicht verdauten Keimen die nicht verdauten Zellwände um etwa 30 % stärker toxisch wirkten, während die Toxizität der nicht verdauten Protoplasten um etwa das 4-5fache geringer war als die der intakten, nicht verdauten Keime.

Keimmaterial	hitzebehandelt	hitzebehandelt und verdaut
intakte Keime	0,2986	0,0007
Zellwände	0,1970	0,0031
Protoplasten	1,3719	0,0325

Tab. 2: Vergleich der LD_{50} -Werte (mg Tr.S./Maus) hitzebehandelter intakter Keime, Zellwände und Protoplasten im unverdauten Zustand und nach Verdauung.

Durch die Trypsinverdauung wurde sowohl bei den intakten Keimen als auch bei den Zellwänden und Protoplasten eine Steigerung der Toxizität erreicht. So erhöhte sich die Toxizität der intakten Keime, wie erwartet, um drei, die der Zellwände und Protoplasten dagegen nur um zwei Zehnerpotenzen.

Im Vergleich zu den intakten, verdauten Keimen war die Toxizität der verdauten Zellwände um das 4-5fache und die der verdauten Protoplasten um das etwa 5fache geringer.

Die Zellwände wirkten um eine Zehnerpotenz toxischer als die Protoplasten, sowohl im unverdauten als auch im verdauten Zustand.

3.2.3. Serumneutralisationsversuche

Im zweiten Teil der Untersuchungen erfolgten Neutralisationsversuche mit einem gegen verdauete, intakte Keime gewonnenen Immunserum. Aus den in Tab. 3 (s. S. 18) zusammengestellten ermittelten Werten wurden die neutralisierenden Dosen 50 % (ND_{50}) für die verschiedenen Versuchsreihen errechnet, dargestellt in Tab. 4.

Immunserum	Serumverdünnungsstufe der ND_{50}
nicht abgesättigt	1 : 119
mit intakten Keimen abgesättigt	< 1 : 8
mit Zellwänden abgesättigt	1 : 11
mit Protoplasten abgesättigt	1 : 69

Tab. 4: Gegenüberstellung der ND_{50} -Werte hitzebehandelter, verdauter intakter Keime, Zellwände und Protoplasten nach Neutralisation mit nicht abgesättigtem Immunserum sowie mit verschiedenen abgesättigten Immunseren.

Serum- ver- dünn- ungs- stufe	nicht abgesättigtes Serum	mit intakten Keimen abgesättigtes Serum	mit Zellwänden abge- sättigtes Serum	mit Protoplasten abge- sättigtes Serum
	Anzahl der Tiere Sterb- gestor- überle- ben	Anzahl der Tiere Sterb- gestor- überle- ben	Anzahl der Tiere Sterb- gestor- überle- ben	Anzahl der Tiere Sterb- gestor- überle- ben
	lich- keits- rate (%)	lich- keits- rate (%)	lich- keits- rate (%)	lich- keits- rate (%)
1: 8	0 5 0	5 0 100	0 5 0	0 5 0
1: 16	0 5 0	5 0 100	5 0 100	0 5 0
1: 32	0 5 0	5 0 100	5 0 100	0 5 0
1: 64	0 5 0	5 0 100	5 0 100	2 3 40
1: 128	3 2 60	5 0 100	5 0 100	5 0 100
1: 256	5 0 100			

Tab. 3: Neutralisationsversuche

Pro Maus wurden 0,0014 mg Tr.S. hitzebehandelter, verdauter Keime nach Vermischung und Inkuba-
tion mit den angegebenen Serumverdünnungsstufen (0,2 ml Keimmaterial-Serumgemisch) i.p. injiziert.

So ergab der Neutralisationsversuch mit nicht abgesättigtem Immunserum eine ND_{50} von 1 : 119. Die Absättigung mit verdauten intakten Keimen entfernte die toxinneutralisierenden Antikörper erwartungsgemäß ($ND_{50} < 1 : 8$). Das mit Zellwänden abgesättigte Serum schützte noch mit einer ND_{50} von 1 : 11 und das mit Protoplasten behandelte mit einer ND_{50} von 1 : 69.

Da im Protoplastenmaterial etwa 20 % scheinbar intakte Keime beobachtet wurden, erschien es zweckmäßig, den Einfluß dieses Anteils auf den Neutralisationsversuch zu prüfen, denn es hätte sein können, daß der Absättigungseffekt allein auf den scheinbar intakten Keimen beruhte. Deshalb wurde ein zusätzlicher Neutralisationsversuch durchgeführt, bei dem ein Immunserum Verwendung fand, welches dreimal mit Protoplasten abgesättigt worden war. Falls die scheinbar intakten Keime für die Reduktion des Neutralisationstiters verantwortlich waren, hätte dieses Serum einen geringeren Titer aufweisen müssen. Tab. 5 (s. S. 20) zeigt, daß die Werte nach zweimaliger und nach dreimaliger Absättigung des Immunserums mit Protoplasten übereinstimmen.

Serum- verdün- nungs- stufe	Zweimal mit Protoplasten abges. Immunserum			Dreimal mit Protoplasten abges. Immunserum		
	Anzahl der (Tiere gestor- über- ben lebend	Sterblich- keitsrate (%)		Anzahl der Tiere gestor- über- ben lebend	Sterblich- keitsrate (%)	
1 : 8	0	5	0	0	5	0
1 : 16	0	5	0	0	5	0
1 : 32	0	5	0	0	5	0
1 : 64	2	3	40	2	3	40
1 : 128	5	0	100	5	0	100

Tab. 5: Vergleich der Neutralisationsversuche, die unter Verwendung von

a) zweifach mit Protoplasten abgesättigtem Immunserum

b) dreifach mit Protoplasten abgesättigtem Immunserum

durchgeführt wurden.

Pro Maus wurden 0,0014 mg Tr.S. hitzebehandelter, verdauter Keime nach Vermischung und Inkubation mit den angegebenen Serumverdünnungsstufen (0,2 ml Keimmateri-
Serungemisch) i.p. injiziert.

4. Besprechung der Ergebnisse

Auf Grund der Feststellung, daß aerobe Sporenbildner toxische Aktivität zeigen, die an den Bakterienkörper gebunden sein muß und sich durch Trypsin aktivieren läßt, stellte sich die Frage nach der Lokalisation dieser Toxine.

In erster Näherung wurde davon ausgegangen, daß die toxisch wirkenden Stoffgruppen, die durch die Verdauung entstehen oder freigesetzt werden, im Bereich der Zellwände lokalisiert sind. Diese Annahme findet eine Stützung durch Versuche von HELLMANN (1972 b), die ergeben haben, daß das Trockensubstanzgewicht trypsinverdauter Keime um lediglich 1,8 % geringer ist als das der nicht verdauten. Bei derartig geringfügigen Eingriffen in die Bakteriensubstanz ist kaum anzunehmen, daß tiefergehende, über die Bakterienwand hinausgreifende Veränderungen zustande kommen.

Ein Vergleich der toxischen Wirkung der unbehandelten intakten Keime und der unbehandelten Zellwände scheint diese Arbeitshypothese zu bestätigen. Die Zellwände waren deutlich stärker toxisch als die intakten Keime. Indessen steigerte die Trypsinverdauung die Toxizität der Zellwände weit weniger als die der intakten Keime, mit der Folge, daß im verdauten Zustand die intakten Keime deutlicher toxischer waren als die Zellwände. Dieses Untersuchungsergebnis widerspricht den bisher beim Toxizitätsvergleich verschiedener Stämme gewonnenen Erfahrungen (HELLMANN 1972). Bei diesen hatte es sich gezeigt, daß - unabhängig von dem im verdauten Zustand absolut höheren Toxizitätsgrad - im Verhältnis der Stämme zueinander kein Unterschied zwischen verdauten und unverdauten Präparaten bestand. Das hiervon jetzt abweichende Untersuchungsergebnis könnte damit erklärt werden, daß der für die Gewinnung der Zellwände benutzte Ultraschall

auch in die Zellwandstruktur eingegriffen hat und die dabei aufgetretenen Veränderungen von gleicher Art gewesen sind, wie sie die Trypsinverdauung bewirkt. Dies könnte eine Teilaktivierung der für die Toxizität der Zellwände verantwortlichen Substanzen zur Folge gehabt haben. Die Ultraschallwirkung braucht aber dabei nicht stehengeblieben zu sein, sondern kann weitergehend die toxisch aktiven Strukturen zerstört haben. Somit konnte die Trypsinverdauung die Toxizität der Zellwandpräparate nicht mehr im gleichen Maße steigern, wie die der nicht mit Ultraschall behandelten Keime. Die Zellwandpräparate waren somit weder vor noch nach der Trypsinverdauung für einen Toxizitätsvergleich mit den intakten Keimen geeignet und fallen für eine schlüssige Beantwortung der Frage, ob man in den Zellwänden die Träger der toxischen Substanzen der Bazillen sehen kann, aus. Es bleibt nur die Möglichkeit, sich auf dem Umweg über den Vergleich der Aktivität von Protoplasten und intakten Keimen indirekt über die Bedeutung der Zellwände zu informieren.

Bei Beurteilung der Ergebnisse der Toxizitätsversuche mit Protoplasten muß berücksichtigt werden, daß im Protoplastenmaterial noch ein Anteil von etwa 20 % an scheinbar intakten Keimen mikroskopisch sichtbar war. Vergleicht man die LD_{50} -Werte von nicht verdauten, intakten Keimen und nicht verdauten Protoplasten, könnte man annehmen, daß die toxische Wirkung des Protoplastenmaterials von seinem Anteil an intakten Keimen herrührt. Denn es ist auffallend, daß dieser Anteil auf etwa 20 % geschätzt wurde und die LD_{50} des Protoplastenmaterials annähernd 20 % der LD_{50} der intakten Keime beträgt. Dieser Annahme widerspricht aber die Tatsache, daß die Toxizitätssteigerung des Protoplastenmaterials durch Trypsinverdauung um eine Zehnerpotenz geringer war als die Toxizitätssteigerung der intakten Keime. Ebenso läßt das Ergebnis der Neutralisationsversuche erkennen, daß die von

dem Protoplastenpräparat ausgehende Toxizität eine andere Grundlage hat als die der intakten Keime. Mit den Protoplasten ließen sich die von den intakten Keimen ausgehenden Antikörper nur teilweise absättigen. Mithin ist die vom Protoplastenpräparat ausgehende Toxizität den Protoplasten und nicht den in ihm verbliebenen scheinbar intakten Keimen zuzuschreiben.

Durch die Serumneutralisationsversuche sollte festgestellt werden, ob für die von den intakten Keimen nach der Verdauung ausgehenden toxischen Wirkungen lediglich ein einziges, strukturell einheitliches Substrat verantwortlich ist, oder ob die Toxizität von Protoplasten und intakten Keimen bzw. Zellwänden von Toxinen mit unterschiedlicher Antigenstruktur ausgeht. Es zeigte sich, daß durch die Absättigung mit Protoplasten ein Teil der toxinneutralisierenden Wirkung des durch Verimpfung verdauter intakter Keime hergestellten Kaninchenimmunserums verschwindet. Andererseits gelang es durch Absättigung mit Zellwänden nicht, die neutralisierende Wirkung des Serums völlig aufzuheben. Wenn man nicht annehmen will, daß durch die oben diskutierte Zerstörung eines Teils der toxisch aktiven Strukturen der Zellwände durch Ultraschall eine einzelne Komponente mit einem Antigenaufbau, der dem der an die Protoplasten gebundenen toxischen Substanzen entspricht, selektiv eliminiert wurde, ist der Schluß zulässig, daß die von den Protoplasten ausgehende toxische Aktivität auf Substanzen beruht, die im Bereich der Zellwand nicht vorkommen. Als weitere Folge ergibt sich, daß die toxische Aktivität der Protoplasten zu der Toxizität der intakten Keime beiträgt. Diese Feststellung mag überraschen, wenn man bedenkt, daß einerseits nach den Untersuchungen von SALTON (1964) an *B. subtilis* die Bakterienwand etwa ein Drittel der Gesamtbakterienmasse ausmacht und damit die Protoplasten massiv nach außen abschirmt, und andererseits auf Grund des oben erwähnten Gewichtsvergleiches verdauter und unverdauter Keime mit einer tiefgreifenden Wirkung

des Trypsins nicht gerechnet werden kann. Allerdings wird man den Anteil der von den Protoplasten ausgehenden Toxizität an der Gesamtoxizität der verdauten Bazillen auch nicht allzu hoch einzuschätzen haben: der nach Absättigung des Serums mit Protoplasten verbleibende Serumneutralisationstiter war wesentlich höher als der nach Absättigung mit den Bazillenwandpräparaten. Zum gleichen Schluß führte der Vergleich zwischen der toxischen Wirkung der verdauten Protoplastenpräparate und der verdauten intakten Keime.

Damit läßt sich die Frage nach der Lokalisation der für die Toxizität der verdauten intakten Keime verantwortlichen Substanzen dahingehend beantworten, daß die toxische Wirkung ihren Ausgang im wesentlichen von den Zellwänden nimmt und zum geringen Teil an Substanzen gebunden ist, die im Bereich des Zellplasmas und/oder der Zellmembran vorkommen. Die antigene Struktur der letzteren ist wahrscheinlich verschieden von der des Zellwandtoxins. Die Annahme liegt nahe, daß es sich um funktionell verschiedene stoffliche Substanzen handelt. Als gesichert kann gelten, daß die von den verdauten Bazillen im ganzen ausgehende toxische Wirkung auf mindestens zwei Toxinen unterschiedlicher antigenen Struktur beruht.

5. Zusammenfassung

Durch Toxizitätsprüfungen an weißen Mäusen sollte festgestellt werden, ob das von HELLMANN (1972 a) bei Bazillen nachgewiesene, durch Trypsinverdauung der Keime aktivierbare Toxin nur in der Zellwand oder auch im Protoplasten lokalisiert ist. Die Versuche wurden mit einem aus einem Lebensmittel isolierten und als *B. megaterium* bestimmten Bazillenstamm aus der Sammlung des Landesveterinäruntersuchungsamtes Berlin vorgenommen.

Folgende Resultate wurden erzielt:

- 1.) Die Toxizität der Protoplasten ist wesentlich geringer als die der intakten Keime und läßt sich durch Trypsinverdauung nicht im gleichen Maße steigern. Es ist daher anzunehmen, daß das aktivierbare Toxin vor allem in der Zellwand lokalisiert ist. Aus methodischen Gründen gelang es nicht, diese Annahme durch Versuche mit isolierten Zellwänden zu bestätigen. Offenbar wurde bei der Zellwandgewinnung, die mittels Ultraschall erfolgte, ein Teil der durch Trypsinverdauung aktivierbaren Toxine zerstört.
- 2.) Neutralisationsversuche mit abgesättigten Seren ergeben, daß die intakten Keime nach der Verdauung mehrere, und zwar mindestens 2 Toxine von unterschiedlicher antigener Spezifität besitzen. Die eine der beiden Komponenten scheint nur im Bereich der Protoplasten vorzukommen, die andere nur im Bereich der Zellwände. Auch die Ergebnisse der Absättigungsversuche lassen den Schluß zu, daß die von den Protoplasten ausgehende toxische Aktivität für die Gesamtaktivität des untersuchten Bazillenstammes von geringer Bedeutung ist.

6. Literaturverzeichnis

1. BARKULES, S.S. and M.F. JONES:
Studies of streptococcal cell walls.
J. Bact. 74 (1957) 267
2. BONVENTRE, P.F. and L.L. KEMPE:
Physiology of toxin production by Clostridium botulinum
Types A and B. IV. Activation of the Toxin.
J. Bact. 79 (1960) 24
3. BONVENTRE, P.F. and N.J. ECKERT:
The biologic activities of Bacillus anthracis and Bacillus
cereus culture filtrates.
The Amer. Pathol. 43 (1963) 201
4. BURDON, K.L. and R.D. WENDE:
On the differentiation of anthrax bacilli from B. cereus.
J. infect. Dis. 107 (1960) 224
5. CAVALLI-SFORZA, L.:
Biometrie.
Gustav Fischer Verlag Stuttgart (1969)
6. FITZ-JAMES, P.C.:
Cytological and chemical of the growth of protoplasts of
B. megaterium.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 4 (1958) 257
7. GOEPFERT, J.M., W.M. SPIRA and H.U. KIM:
Bacillus cereus: Food poisoning organism. A. review.
J. Milk Food Technol. 35 (1972) 213

8. HELLMANN, E.:
Enthalten aerobe Sporenbildner durch Trypsinverdauung
aktivierbare Endotoxine?
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 221 (1972 a) 206
9. HELLMANN, E.:
Persönliche Mitteilung (1972 b)
10. JOHNSON, CH.E. and P.F. BONVENTRE:
Lethal toxin of *Bacillus cereus*. I. Relationship and
nature of toxin, hemolysin and phospholipase.
J. Bact. 94 (1967) 306
11. KRIEG, A.:
Über die Differenzierung der Mäusetoxizität des *Bacillus*
cereus und des *Bacillus thuringiensis* von der Mäusepa-
thogenität des *Bacillus anthracis*.
Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 215 (1970) 523
12. MOLNAR, D.M.:
Separation of the toxin of *Bacillus cereus* into two
components and non identity of the toxin with phospholipase.
J. Bact. 84 (1962) 147
13. NYGREN, B.:
Lecithinase-producing bacteria and food poisoning.
Acta path. microbiol. scand. 51, Suppl. 144 (1961) 297
Ref. Zbl. Bakt., I. Abt. Ref. 187 (1963) 216
14. ROTMAN, B.:
On the mechanism of sonic lysis of bacteria.
J. Bact. 72 (1958) 827

15. SALTON, M.R.J.:

The composition of the cell walls of some Gram-positive and Gram-negative bacteria.

Biochim. biophys. Acta 10 (1953) 512

16. SALTON, M.R.J.:

The lysis of micro-organisms by lysozyme and related enzymes.

J. gen. Microbiol. 18 (1958) 481

17. SALTON, M.R.J.:

The bacterial cell wall.

Elsevier Publishing Company, Amsterdam (1964)

18. SALTON, M.R.J. and R.W. HORNE:

Methode of preparation and some properties of cell walls.

Biochim. Biophys. Acta 7 (1951) 177

19. SPIRA, W.M. and J.M. GOEPFERT:

Bacillus cereus-induced fluid accumulation in rabbit ilal loops.

Appl. Microbiol. 24 (1972) 341

20. STAMATIN, N. et S. ANGHELESCO:

Pouvoir pathogène et toxicité de Bacillus cereus.

Ann. Inst. Pasteur 116 (1969) 210

21. TEPPER, B.S., J.A. HAYASHI and S.S. BARKULES:

Studies of streptococcal cell walls.

J. Bact. 79 (1960) 33

22. TOMCSIK, J. und S. GUERX-HOLZER:

Änderung der Struktur der Bakterienzelle im Verlauf der
Lysozymeinwirkung.

Schweiz. Z. allgem. Pathol. u. Bakteriologie. 15 (1952) 517

23. TOMCSIK, J. und S. GUERX-HOLZER:

Antikörperproduktion mit isolierter Bakterienzellwand und
mit Protoplasten.

Experientia 10 (1954) 484

24. VENNES, J.W. and P. GERHARDT:

Immunologic comparison of isolated surface membranes of
Bacillus megaterium.

Science 124 (1956) 535

25. VENNES, J.W. and P. GERHARDT:

Further serological analysis of isolated cellular
structures of *Bacillus megaterium*.

Bacteriol. Proc. (1957) 105

26. VENNES, J.W. and P. GERHARDT:

Antigenic analysis of cell structures isolated from *Bacillus*
megaterium.

J. Bact. 77 (1959) 581

27. WEIBULL, C.:

The isolation of protoplasts from *Bacillus megaterium* by
controlled treatment with lysozyme.

J. Bact. 66 (1953 a) 688

28. WEIBULL, C.:

Characterization of the protoplasmatic constituents of
Bacillus megaterium.

J. Bact. 66 (1953 b) 696

Herrn Prof. Dr. E. Hellmann möchte ich herzlich für die Überlassung des Themas und die mir bei der Durchführung der Arbeit gewährte Unterstützung danken.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern am Landesveterinäruntersuchungsamt Berlin, insbesondere Herrn Dr. J. Hentschke und Fräulein L. Tauscher, für ihre mir bei der Bewältigung technischer Probleme stets gezeigte Hilfsbereitschaft.

Lebenslauf

Am 15.7.1942 wurde ich, Gisela Merck, in Königsberg/Pr. als Tochter des Universitätsprofessors Dr. Erich Kähler und seiner Ehefrau Luise, geb. Günther, geboren.

Nach dem Besuch der Grundschule sowie der Herder-Oberschule in Leipzig von 1948 - 1956 besuchte ich die Eckenerschule in Berlin-Mariendorf und legte dort 1962 die Reifeprüfung ab.

Zwei Semester studierte ich an der Pädagogischen Hochschule Berlin. 1964 begann ich mit dem Studium der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin. Nach Beendigung des Staatsexamens 1970 erhielt ich am 15.10.1970 die Bestallung als Tierärztin.

Von 1971 - 1972 war ich am Landesveterinäruntersuchungsamt Berlin angestellt.

